

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการวิจัย

ใบขลุ่ จากตำบลหนองบัว อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer) ยี่ห้อ Josco รุ่น V-530 ประเทศญี่ปุ่น
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance) ยี่ห้อ Ohaus รุ่น Adventure ประเทศจีน
3. เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary Vacuum Evaporator) ยี่ห้อ EYELA รุ่น SB-651 ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น UNB-450 ประเทศเยอรมันนี
5. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 100-1000 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Nichiryo ประเทศญี่ปุ่น

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. L-ascorbic acid (Lot no.1007089) ยี่ห้อ AJAX ประเทศออสเตรเลีย
2. Chloroform (CHCl_3 , AR grade) (Lot no. 67-66-3) ยี่ห้อ RCI Labscan ประเทศไทย
3. 2, 2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Lot no.STDB4145V) ยี่ห้อSigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. Ethanol absolute (AR Grade, Lot no. 6417) ยี่ห้อ QRèC ประเทศนิวซีแลนด์
5. Ethyl acetate (AR grade, Batch no. 11020181) ยี่ห้อ Labscan ประเทศไทย
6. Ferric chloride (FeCl_3 , Lot no. AF609275) ยี่ห้อ AJAX ประเทศออสเตรเลีย
7. Folin- Calteu reagent (Lot no. BCBK6010V) ยี่ห้อ Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. Formic acid (Lot no. F503332501) ยี่ห้อ QRèC ประเทศนิวซีแลนด์
9. Gallic acid (Lot no. 098K0245V) ยี่ห้อ Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. Methanol (AR grade, Batch No. 11070342) ยี่ห้อ Labscan ประเทศไทย
11. Sodium carbonate (Na_2CO_3 , Lot no. 1201007) ยี่ห้อ AJAX ประเทศออสเตรเลีย
12. Thin layer chromatography (TLC) Aluminum sheets silica gel 60F-254 (Lot no. 0345554) ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมันนี

13. Quercetin 95% (HPLC grade, Lot no. SLBK4625V) ยี่ห้อ Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมใบขลุ้

1.1 นำใบขลุ้ ที่เก็บได้จากจังหวัดจันทบุรี มาล้างเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (Blender)

1.2 พิสูจน์เอกลักษณ์พืช ที่พิพิธภัณฑิ์พืชสิรินธร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การสกัดใบขลุ้ (Extraction)

ซังใบขลุ้ที่บดแห้งแล้วปริมาณ 300 g นำไปห่อด้วยผ้าขาวบางมัดให้แน่น จากนั้นนำไปใส่ภาชนะที่มีฝาปิดสนิท แล้วทำการสกัดโดยวิธีการหมัก (maceration technique) ด้วยตัวทำละลายเอทานอล (95% ethanol, EtOH) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดออกมากรองเก็บไว้ แล้วนำกากใบขลุ้มาแช่ต่อด้วยตัวทำละลายชนิดเดิม ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary Vacuum Evaporator) จะได้สารสกัดหยาบชั้นเอทานอล (ethanolic extract) ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้ เพื่อคำนวณหาร้อยละของน้ำหนักร (%yield) ของสารสกัดหยาบ และเก็บไว้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) ของสารสกัดจากใบขลุ้ ด้วยวิธี DPPH assay (ดัดแปลงจาก Viyoch, Buranajaree, Grandmottet, Robin, Binda, Viennet, Waranuch, Humbert, 2010)

เตรียมสารสกัดจากใบขลุ้ ให้มีความเข้มข้นต่างๆ (0.0390–5.0 mg/mL) จากนั้นผสมสารละลายสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.7 mL กับสารละลาย 0.2 mM DPPH ปริมาตร 1.3 mL เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 515 nm ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV–VIS Spectrophotometer) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่า Free radical scavenging activity (%) โดยใช้วิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ครั้ง (triplicate)

$$\text{Free radical scavenging activity (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

เมื่อ A_{sample} = ค่า Absorbance ที่วัดได้ของสารผสมระหว่างสารละลาย DPPH กับสารตัวอย่าง

$$A_{\text{control}} = \text{ค่า Absorbance ที่วัดได้ของสารละลาย DPPH}$$

จากนั้นคำนวณหาค่าการกำจัดอนุโมลอิสระได้ 50% (half maximal effective concentration, EC₅₀) โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 3.02 (Graph Pad Software ประเทศสหรัฐอเมริกา)

4. การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic content) ในสารสกัดใบขลุ่ย โดยวิธี Folin–Ciocalteu assay (ดัดแปลงจาก Noridayu et al., 2011)

4.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของกรดแกลลิก (gallic acid)

4.1.1 นำสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 1 mg/mL มาเจือจางด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้นเป็น 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.8 mg/mL โดยแยกแต่ละหลอดการทดลอง

4.1.2 จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานแกลลิกในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 mL เติมน้ำกลั่น (DI water) ปริมาตร 2.8 mL เขย่าให้เข้ากันดี และเติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na₂CO₃) เข้มข้น 2.0 % ปริมาตร 2.0 mL ผสมสารละลายและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นเติม สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent เข้มข้น 50% ปริมาตร 0.1 mL ลงในส่วนผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV–VIS Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 750 nm ทำการทดลอง 3 ครั้ง (triplicate)

4.1.3 นำค่าค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานแกลลิกที่ความยาวคลื่น 750 nm และความเข้มข้นของสารมาตรฐานแกลลิกมาเขียนกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดต่อไป

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบใบขลุ่ย

4.2.1 เตรียมความเข้มข้นของสารสกัด ให้มีความเข้มข้น 1.0 g/mL โดยนำสารสกัดหยาบจากใบขลุ่ย ปริมาณ 1.0 g ละลายด้วยตัวทำละลายเอทานอล ปริมาตร 1.0 mL ผสมให้เข้ากัน

4.2.2 ปิเปตต์สารละลายสารสกัด มา 0.1 mL เติมน้ำกลั่น (DI water) ปริมาตร 2.8 mL และเติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na₂CO₃) เข้มข้น 2.0 % ปริมาตร 2.0 mL ผสมสารละลายและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นเติม สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent เข้มข้น 50% ปริมาตร 0.1 mL ลงในส่วนผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV–VIS Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 750 nm ทำการทดลอง 3 ครั้ง (triplicate)

4.2.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานแกลลิก คำนวณในรูปมิลลิกรัมสมมูลของ gallic acid equivalents (GAE) ต่อ สารสกัด 1 g

5. การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบใบขลุ่ย ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) (ดัดแปลงจาก Traithip, 2005)

การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบใบขลุ่ยชั้นเอทานอล ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) โดยอาศัยการแยกของสารสกัด สารดูดซับ (adsorbent) ที่ใช้เป็น silica gel F-254 นำสารสกัด และสาร quercetin ซึ่ง spot ลงบนแผ่น TLC แล้วนั้น นำไป development ในระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งทำในระบบปิด โดยระบบที่ใช้แยกสารสกัดคือ CHCl_3 : ethyl acetate (EtOAc): formic acid ในอัตราส่วน 1:1:0.1 จากนั้นนำแผ่น TLC ออกจาก Tank ที่ใช้เป็นระบบปิด แล้วทำให้แห้ง และพ่นด้วย DPPH reagent และ 10% ferric chloride (FeCl_3) reagent และสารมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบคือ quercetin

6. การวิเคราะห์ผลข้อมูล (Statistic analysis)

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง ($n=3$) ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อแสดงร้อยละ (percentage) ของข้อมูลค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และมีการเปรียบเทียบข้อมูลกลุ่มที่มีสารสกัด และกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ไม่มีสารสกัด